

## INCLUSIONES CITOPLASMÁTICAS INDUCIDAS POR EL VIRUS DE LA MANCHA ANILLADA DE LA LECHOSA, TIPO P (PRSV-P), EN CALABACÍN, *Cucurbita pepo* L.

### CYTOPLASMIC INCLUSIONS INDUCED BY THE PAPAYA RINGSPOT VIRUS, TYPE P (PRSV-P) IN THE PUMPKIN *Cucurbita pepo* L.

CARLOS VELÁSQUEZ<sup>1</sup>, MARÍA G. DE MEJÍA Y.<sup>2</sup>, GILMA HERNÁNDEZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán (CIEG-UDO).

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Escuela de Ciencias. Núcleo de Sucre

<sup>3</sup>IIBCA, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

#### RESUMEN

Se inocularon plantas sanas de calabacín, *Cucurbita pepo* L, con el virus papaya ringspot, tipo P (PRSV-P), potyvirus que causa la mancha anillada en la lechosa, *Carica papaya* L, con el objeto de dilucidar la citopatogenicidad asociada mediante un estudio ultraestructural. Se encontraron inclusiones cilíndricas y amorfas que son inducidas por el virus, asociadas en los primeros estadios de infección con los plasmodesmos, resaltando la presencia de inclusiones cilíndricas "pinwheels" o en forma de aspas de molinos, que son exclusivamente inducidas por potyvirus. También se observaron invaginaciones y alteraciones en la membrana plasmática y en los cloroplastos, respectivamente, relacionados con la infección.

PALABRAS CLAVE: Calabacín, *Cucurbita pepo*, Potyvirus, Aspas de molinos, Ultraestructura, *Carica papaya*

#### ABSTRACT

In this research, healthy pumpkin plants, *Cucurbita pepo* L, were inoculated with the papaya ringspot virus, type P (PRSV-P), a potyvirus which causes the annulated spot in the papaya, *Carica papaya* L. Our purpose was to evaluate the cytopathogenicity associated to it, by means of an ultrastructural study. We found cylindrical and amorphous inclusions, which are induced by the virus and are associated in the first stages of infection with the plasmodesmata. Most conspicuous was the presence of pinwheel cylindrical inclusions, which are exclusively induced by potyviruses. We also observed invaginations and alterations, in the plasmatic membrane and in the chloroplast respectively, which were related with this infection.

KEY WORDS: Pumpkin plant, *Cucurbita pepo*, Potyvirus, Pinwheels, Ultrastructural, *Carica papaya*.

Los virus vegetales se caracterizan, entre otras cosas, porque inducen en las células del huésped inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares, que en algunos grupos virales son típicas, evidenciando la infección. Los constituyentes de estas inclusiones pueden ser componentes alterados del huésped, agregados de virus, agregados de la proteína de la cápside, proteínas codificadas por el virus, proteínas del virus y mezclas de éstas con proteínas del huésped. Estas inclusiones difieren de los constituyentes citoplasmáticos y nucleares de la célula huésped y son reconocibles estructural (Christie & Edwarson, 1986), ultraestructural (Ammar *et al.*, 1994; Calder & Ingerfeld, 1990) y serológicamente (De Mejía *et al.*, 1985; Quiot-Douine *et al.*, 1986).

El virus de la mancha anillada de la lechosa, es una partícula flexuosa de 780 X 12 nm y su genoma consiste de una banda simple de ARN con polaridad positiva (De La Rosa & Lastra, 1983), tiene una proteína simple en su cápside de 36 000 KDa (Gonsalves & Ishii, 1980; Purcifull & Hiebert, 1979; Quiot-Douine *et al.*, *op. cit.*), e induce inclusiones cilíndricas características en el citoplasma de las células huéspedes, en forma de aspas de molinos o "pinwheels" e inclusiones amorfas (Martelli & Russo, 1976).

En *Carica papaya* L., los síntomas se manifiestan por un profundo moteado y arrugamiento del parénquima foliar alrededor de las nervaduras, las hojas jóvenes son de tamaño reducido, se tornan cloróticas y malformadas y las mas viejas caen, quedando los árboles sin copos o casi desnudos. En los pecíolos, tallos y frutos de las plantas enfermas, se observan manchas verde oscuras y listas alar-

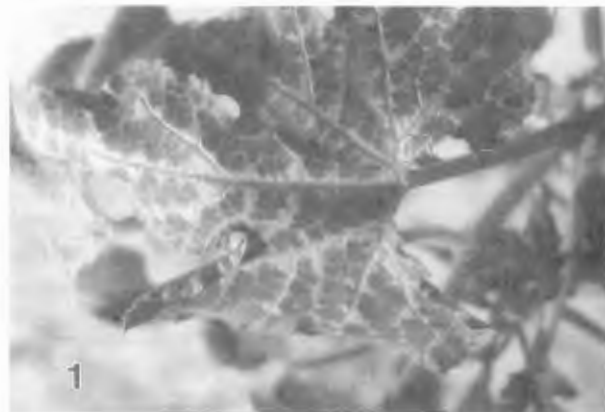
gadas, acuosas o aceitosas; además, en los frutos se localizan manchas de aspecto acuoso, circulares o concéntricas que le dan el nombre a la enfermedad.

Dado que en el noreste de Venezuela, específicamente en el Estado Sucre, se ha observado los síntomas de esta enfermedad en los cultivares de lechoso, se propuso en este trabajo dilucidar ultraestructuralmente aspectos del mecanismo de propagación del virus y la citopatogenicidad asociada en el calabacín, *Cucurbita pepo* L., utilizando como fuente de inóculo el virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV-P), aislado de *C. papaya*.

Se cultivaron plantas sanas de calabacín, *C. pepo* y de lechoso, *C. Papaya* en jaulas protegidas con mallas antiáfidos. Los inóculos del virus se prepararon macerando hojas infectadas de *C. papaya* en solución de buffer fosfato,  $0,2 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , pH 8,0 a  $4^\circ\text{C}$  y se aplicaron mecánicamente en plantas sanas de *C. pepo*. También se reinocularon plantas sanas de *C. papaya* y de *C. pepo*, a partir de plantas de *C. pepo* infectadas con el virus de la mancha anillada de la lechosa. Durante la postinoculación se tomaron diariamente muestras de hojas por un período de quince días y, se procesaron para microscopía electrónica de transmisión, con el objeto de evidenciar los posibles cambios ultraestructurales que ocasiona en el proceso de infección el virus en el huésped. Secciones de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  de la lámina foliar de *C. pepo* infectado con PRSV-P, fueron fijadas en glutaraldehído al 5 % en buffer fosfato  $0,2 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , pH 8,0, durante 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ , luego se lavaron en buffer fosfato y se postfijaron con tetróxido de Osmio al 2 % acuoso por 5 horas a  $4^\circ\text{C}$ , seguidamente se lavaron en agua destilada y se precontrastaron con acetato de uranilo al 2 % en etanol al 30 %, a  $4^\circ\text{C}$  por 30 minutos, posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de etanol, del 30 al 100 % y se infiltraron e incluyeron en resina Spurr. A las preparaciones se le hicieron cortes ultrafinos y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo; analizándose ultraestructuralmente en un microscopio electrónico de transmisión, Hitachi H-600.

Las plantas de *C. pepo* inoculadas con PRSV-P, presentaron los mismos síntomas que se manifiestan en *C. papaya*, tales como moteado del parénquima foliar alrededor de las nervaduras, hojas reducidas y malformadas y copos casi desnudos (figs. 1 y 2). En las plantas reinoculadas de lechoso y mantenidas en el campo libre de áfidos, los frutos presentaron listas alargadas acuosas o aceitosas y manchas anilladas (fig. 3). Ultraestructuralmente se evidencian inclusiones amorfas (IA) y cilíndricas (IC) en las células del mesófilo de *C. pepo*. En los primeros días de la postinoculación se observaron las inclusiones cilíndricas y amorfas adosadas a la membrana plasmática (figs. 4 y 5) y muy próximas a los

plasmodesmos, mostrando estrecha relación con organelos membranosos como el retículo endoplasmático rugoso. Por lo general, en los primeros estadios de la infección se observó la membrana plasmática con muchas invaginaciones y se aprecia como estas invaginaciones se desarrollan, convirtiéndose en vesículas, que luego se desprenden en el citoplasma (fig. 6).



Figuras 1. *Cucurbita pepo* infectado con PRSV-P. Las nervaduras y sus alrededores están claros



Figuras 2. *Cucurbita pepo* infectado con PRSV-P. Hojas deformadas y achaparradas



Figura 3. Frutos alterados de *Carica papaya* presentando síntomas de infección con PRSV-P, tales como rayas aceitosas y acuosas en su superficie (L) y manchas anilladas (A).



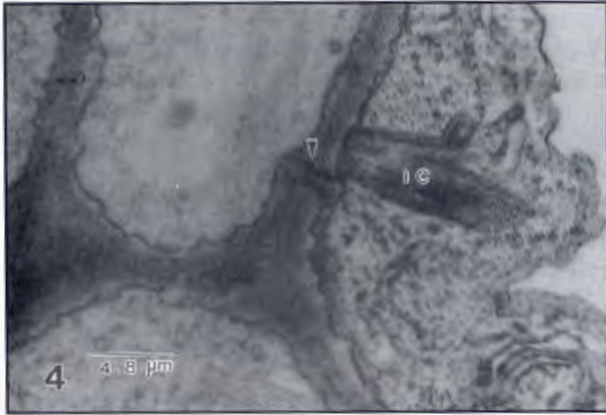


Figura 4. Inclusiones cilíndricas (IC) en células de *C. pepo* adosadas a invaginaciones de la membrana plasmática, adyacentes a plasmodesmos (flechas) y al retículo endoplasmático rugoso (\*).

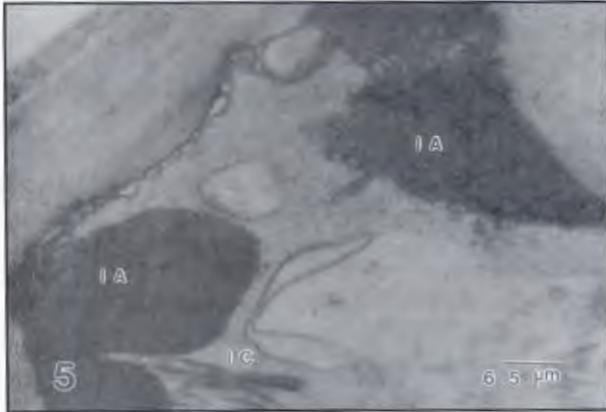


Figura 5. Inclusiones amorfas (IA) y cilíndricas (IC) en células del mesófilo de *C. pepo*, adosadas a invaginaciones de la membrana plasmática.

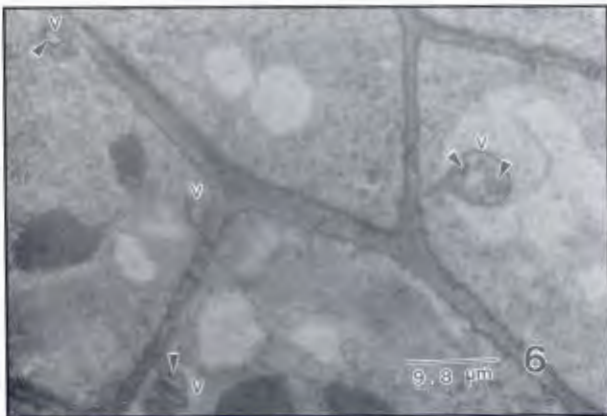


Figura 6. Secciones de células del parénquima en empalizada de *C. pepo* mostrando la Formación de vesículas (V) en la membrana citoplasmática y cerca a los plasmodesmos, y su incorporación en el citoplasma. Estas vesículas contienen en su interior material electrodensso (flechas).

En el transcurso de la postinoculación se observaron cloroplastos con muchos amiloplastos y con deformaciones (fig. 7). También se evidenciaron en el citoplasma de las células infectadas inclusiones cilíndricas, entre ellas, las aspas de molinos (fig. 8), que son las predominantes, con mayor incidencia en células del parénquima en empalizada y de la epidermis abaxial. La ultraestructura de células de tejido foliar, obtenidos entre los doce a los quince días de postinoculado presentó abundantes invaginaciones en la membrana plasmática y muchas vacuolas intracitoplasmáticas (fig. 9).

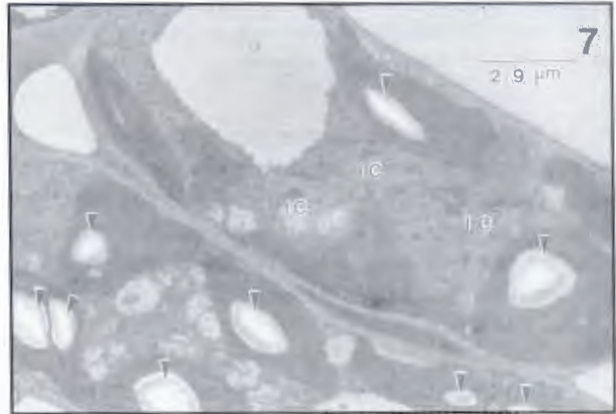


Figura 7. Secciones de células del parénquima en empalizada de *C. pepo* con inclusiones cilíndricas (IC) y leucoplastos (flechas) en los cloroplastos.

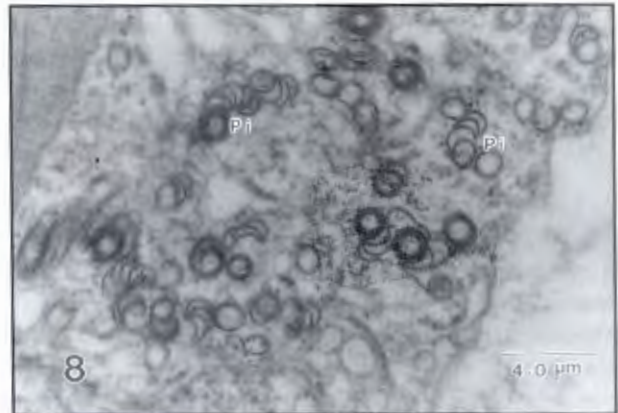


Figura 8. Inclusiones en forma de aspas de molinos o "pinwheels" (Pi) en el citoplasma de células del mesófilo de *C. pepo*.

La evidencia de inclusiones virales en el citoplasma de las células del tejido foliar de *C. pepo*, entre ellas, las aspas de molino, determina que la infección es causada por el virus de la mancha anillada de la lechosa tipo P (PRSV-P), único potivirus que infecta este cultivar y de donde se inoculó.

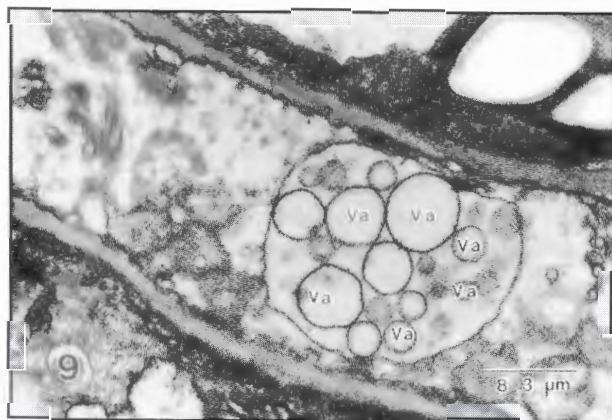


Figura 9. Vacuolas (Va) de diferentes tamaños en el citoplasma de célula del parénquima en empalizada de *C. pepo*.

En Venezuela se ha descrito para el lechoso, *C. papaya*, diversas enfermedades de origen bacteriano y viral (Avilan *et al.*, 1992; Guevara *et al.*, 1993). Entre las virales se encuentra la mancha anillada de la lechosa causada por virus del mismo nombre, tipo P, la cual reviste mucha importancia económica porque afecta cosechas de lechoso, con una frecuencia que va desde un 20 % hasta un 90 % en plantaciones en los Estados Anzoátegui y Miranda (Avilan, *op. cit.*). Estos daños comerciales también se dan en otras regiones tropicales y subtropicales (Wang *et al.* 1994; Wang & Yeh, 1992). La observación de la estructura fina del tejido foliar de *C. pepo* inoculado con PRSV-P, obtenido de *C. papaya*, permitió dilucidar algunos aspectos que están involucrados en el mecanismo de penetración y propagación del virus PRSV-P en las células huéspedes. La presencia de inclusiones amorfas y cilíndricas, particularmente en forma de aspas de molinos confirman que la infección es causada por potyvirus (Christie & Edwarson, 1986).

Las células del mesófilo de plantas de *C. pepo* infectadas con PRSV-P, presentaron muchas invaginaciones en la membrana citoplasmática, lo que sugiere que éstas al desarrollarse forman vesículas que se desprenden en el citoplasma, y pueden intervenir en la propagación del genoma viral y por consiguiente en el proceso de penetración del virus de célula a célula, dado que la mayoría de las inclusiones intracitoplasmáticas que se forman en las primeros estadios de la infección, están cercanas a los plasmodesmos que, probablemente facilitan el paso del genoma viral. Calder & Ingerfeld (1990) analizaron la presencia de estas inclusiones y su asociación con el virus del mosaico de las plántulas del guisante (PSbMv), del grupo de los potyvirus, y encontraron que las inclusiones, incluso las aspas de molino, guardaban relación con el retículo endoplasmático rugoso y otros organelos celulares.

Los cloroplastos de las células foliares de *C. pepo* infectadas con el PRSV-P, presentaron más de un amiloplasto, lo cual constituye una degeneración por la pérdida o reducción de su contenido de clorofila, que se manifiesta externamente en aclaramiento de las nervaduras y áreas adyacentes. Alteraciones en células del mesófilo de *Triticum aestivum* L. encontraron Gao & Nassuth (1993) a nivel ultraestructural, en los primeros días de postinoculación con el potyvirus que causa el mosaico veteado del trigo (WSMV), concluyendo que estas alteraciones son respuestas de las células huéspedes a la infección viral.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación y al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO) por la colaboración prestada en la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMAR, E., E. RODRÍGUEZ, J. SHAW & T. PIRONE. 1994. Association of virions and coat protein of tobacco vein mottling potyvirus with cylindrical inclusions in tobacco cells. *Phytopathology* 84: 520-524.
- AVILAN, L., F. LEAL Y D. BATISTA. 1992. Manual de fruticultura. Tomo I. Segunda edición. Editorial América. Caracas. 776 p.
- CALDER, L. & M. INGERFELD. 1990. The roles of the cylindrical inclusions protein of a Potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *J. Structural Biology* 105:62-66.
- CHRISTIE, R. & J. EDWARSON. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Disease* 70:273-279.
- DE LA ROSA, M., & R. LASTRA. 1983. Purification and partial characterization of papaya ringspot virus. *Phytopathol. Z.* 106:329-336.
- DE MEJÍA, M., E. HIEBERT, D. PURCIFULL, D. THORNBURY & T. PIRONE. 1985. Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a nonstructural, virus specific protein related to helper component. *Virology* 142:34-43.
- GAO, J. & A. NASSUTH. 1993. Alteration of major cellular organelles in wheat leaf tissue infected with Wheat Streak Mosaic Rymovirus (Potyviridae). *Phytopathology* 83:206-213.

- GONSALVES, D. & M. ISHII. 1980. Purification and serology de papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70:1028-1032.
- GUEVARA, Y., A. RONDÓN, A. MASELLI, F. SALCEDO Y J. BETANCOURT. 1993. Marchitez bacteriana del lechoso *Carica papaya* L. en Venezuela. *Agro-nomía tropical* 43:107-116.
- MARTELLI, G. & M. RUSSO. 1976. Unusual cytoplasmic inclusions induced by watermelon mosaic virus. *Virology* 72:352-362.
- PURCIFULL D. & H. HIEBERT. 1979. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathology* 69:112-116.
- QUIOT-DOUINE, L., D. PURCIFULL, E. HIEBERT & M. DE MEJÍA. 1986. Serological relationships and In Vitro translation of an antigenically distinct strain of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 76:346-351.
- WANG, C., H. BAU & S. YEH. 1994. Comparison of the nuclear inclusion and coat protein genes of five papaya ringspot virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. *Phytopathology* 84:1205-1210.
- WANG, C. & S. YEH. 1992. Nucleotide sequence comparison of the 3'-terminal regions of severe, mild, and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. *Arch. Virol.* 127:345-354.